

I. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

КЛОНИРОВАННЫЕ ГЕНЫ, КОДИРУЮЩИЕ БЕЛКИ ХЛОРОПЛАСТА

А. С. ЧУНАЕВ

Методы генной инженерии нашли применение как в создании штаммов-продуцентов биологически активных соединений, так и в исследованиях организации и экспрессии генов [1, 2]. ДНК в клетках эукариот находится в трех компартментах: в ядре, в митохондриях и хлоропластах. Ввиду сходства в организации пластидной и прокариотической ДНК именно хлоропластной ДНК (хпДНК) отводится важная роль в некоторых фотобиотехнологических проектах [7]. При этом предполагается, что энергия, образующаяся при фотосинтезе, будет обеспечивать иные, нежели фиксация CO_2 , синтетические процессы (например, фиксацию азота, или производство химических соединений для нужд промышленности). Современная физико-химическая биология дает обильную информацию о фотосинтетическом преобразовании световой энергии, однако все же недостаточную для разработки модификаций, которые бы существенным образом изменили механизмы фотосинтеза, или повысили их эффективность.

Исследования, позволившие описать некоторые направления изменчивости фотосинтеза, как генетического признака, столкнулись с тем, что мутанты по многим различным генам могут быть лишены всех белковых компонентов одного и того же надмолекулярного комплекса. (Взаимодействие таких комплексов обеспечивает работу фотосинтетического аппарата). Это привело к необходимости использовать молекулярно-биологический подход к изучению белков хлоропласта и генов, которые их кодируют. Такой подход оказался исключительно плодотворным, в последние годы клонирование осуществлено уже как для собственно хлоропластных, так и для ядерных генов, экспрессирующихся в хлоропласте. Клонирование хлоропластных генов является уже отработанным методическим приемом, и предметом обсуждения стали особенности его осуществления [8]. В то время как представления об организации, структуре и экспрессии хлоропластных генов уже сформировались [53], достижения в области клонирования ядерных генов, контролирующих биогенез хлоропласта, ограничиваются исследованиями генов двух наиболее представительных молекулярных маркеров [10—12, 24].

ХЛОРОПЛАСТНЫЕ ГЕНЫ

Общие свойства хлоропластных генов. В хпДНК используются все кодоны, в том числе три кодона терминации трансляции ТАА, ТАГ и

ТГА. В отличие от митохондриальной ДНК для хлДНК нет свидетельств ненормального использования кодонов [18].

Общее содержание ГЦ в хлДНК высших растений составляет 53% [30]. Для изученных последовательностей хлоропластных генов эта величина в первом положении кодона составляет 53%, во втором—34, в третьем—31% [53]. Ввиду вырожденности генетического кода нет оснований полагать, что относительное обогащение хлДНК АТ может вызвать дискриминацию какой-либо из аминокислот. Среднее ГЦ-содержание транслируемых районов десяти генов составляет 42,5% [53].

Целый ряд черт роднит хлоропластные гены с генами прокариот. Так, 5'-лидирующие последовательности хлоропластных генов содержат в (—10) положении от места инициации транскрипции конечное Т от -ТАТААТ-последовательности гекса-блока. (В гене *gbcL* кукурузы соответствующая последовательность находится на расстоянии в 20 п. н. «вверх по течению» от сайта инициации). В районе (—35)-й нуклеотидной пары во всех хлоропластных генах можно видеть в высшей степени консервативную, характерную для прокариот последовательность-ТТГ- [53].

В районе терминирования транскрипции генов *gbcL* шпината [61], кукурузы [35] и петунии [9] и *psbA* шпината и *Nicotiana debneyi* [59] можно видеть типично прокариотическую черту организации генных терминаторов: комплементарные последовательности, способные образовывать короткие шпилькообразные структуры [46].

Номенклатура клонированных хлоропластных генов высших растений построена по правилам, принятым для генов прокариот [53]. С этой системой обозначений сосуществует номенклатура хлоропластных генов *Chlamydomonas reinhardtii* — единственного объекта, у которого осуществлено изучение генетической рекомбинации между этими генами и построение генетической карты [37].

Общее свойство хлоропластных генов — (за исключением гена *trnA*, кодирующего фактор элонгации трансляции [38, 51]) — образование в результате их транскрипции и трансляции полипептидов, участвующих в организации фотосинтетического аппарата. Наиболее очевидной последовательностью изложения имеющихся данных является последовательность участия тех или иных белков в процессе фотосинтеза. В этой очередности мы и будем рассматривать кодирующие их гены.

Гены, кодирующие субъединицы фикобилипротенинов. В то время как информация о белках, входящих в состав внутримембранной антенны хлоропластов наземных растений и зеленых водорослей — хлорофилл *a*-*b*-белковых комплексов, оказалась переданной в ядро на ранних этапах эволюции этих хлоропластов, хлоропласты эукариот, имеющих антенный комплекс в виде фикобилисом, сохранили в своем геноме гены, кодирующие субъединицы фикобилипротенинов. Поскольку эти белки родственны друг другу, возможно, что их эволюция происходила на основе дупликации гена-родоначальника. Район, кодирующий карбоксильный конец β -фикобилианина, локализован на 1,4 тыс. п. н. фрагменте хлДНК из эукариотической водоросли *Cyanophora paradoxa* [44]. Три других клона размером до 5,5 тыс. п. н. ответственны за субъединицы фикобилипротенина, что было показано иммунологическими методами. Все 4 клона структурно перекрываются и транскрибируются в одном уникальном районе пластидного генома.

Гены, кодирующие апопротеины хлорофилл *a*-белковых комплексов фотосистемы II. Гены, кодирующие апопротеины хлорофилл *a*-белковых комплексов (apoX_L, apoY_L) фотосистемы II, локализованы в рестрикционных клонах хлДНК хламидомонады и шпината [4, 45].

В выведенной аминокислотной последовательности 44 000 апоХл. а-БК шпината содержится много гидрофобных аминокислот, большинство из которых объединены в скопления, способные пересечь мембрану. Молекулярная масса почти в 52 000, полученная из выведенной аминокислотной последовательности, превышает экспериментально установленную массу в 44 000. Определения молекулярного веса по данным электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия могут быть весьма неточными, особенно для гидрофобных белков, которые, по всей вероятности, более подвержены конформационным изменениям в амфифильном окружении и имеют большие возможности для связывания детергента. Значительные различия между экспериментально установленными молекулярными массами и таковыми, полученными из анализов нуклеотидных последовательностей, сообщались также для апопротеннов Р680- и Р700-Хл. а-БК и для 32 000-белка [4, 47].

Потенциальные кандидаты для связывания пигментов и хинонов, а также для упорядочивания полипептидов — это гистидины, метионины, лизины и цистеины. 44 000 апоХл. а-БК содержит несколько гистидиновых и метиониновых остатков, которые локализованы в предполагаемых вторичных структурах с сильной гидрофобностью. Большинство из их положений сохраняются, если сравнивать с таковыми апоР680-Хл. а-БК. Некоторые остатки характерным образом разнесены по последовательности и напоминают места связывания протогема в цитохромах b-типа [4]. Представляется вероятным, что гидрофобные последовательности такого рода каким-то образом вовлечены в связывание хлорофилла а.

Ген для «32 000»-тилакоидного мембранного белка. Полипептид с молекулярной массой в 32 000 является составной частью надмолекулярного комплекса фотосистемы II и ответствен за связывание гербицидов, таких как диурон и атразин [50]. Ген *psbA*, кодирующий этот белок, картирован на хлДНК нескольких видов растений [53]. Полные нуклеотидные последовательности *psbA* установлены также для нескольких видов растений и подорослей. Гены *psbA* очень консервативны. Так, *psbA* шпината и *N. debneyi* характеризуются более чем 95% гомологии нуклеотидных последовательностей [59].

Для всех изученных атразин-чувствительных растительных организмов характерно наличие серина в 264-м положении выведенной из *psbA* аминокислотной последовательности, тогда как у пяти известных к настоящему времени атразин-устойчивых мутантов произошли замены на глицин или аланин [22, 19]. Ключевая роль кодона 264 в хлоропластной устойчивости к гербициду указывает на взаимосвязь между этим положением и районом связывания триазлиновых и мочевиновых гербицидов на 32 000-белке [22].

Ген для «32 000»-подобного белка. В хлДНК шпината и хламидомонады обнаружены гены, кодирующие «32 000»-подобный белок [4, 45]. Ген для «32 000»-подобного белка шпината перекрывается на протяжении 50 н. н. с геном для 44 000 апо Хл. а-БК, но эти гены считаются в различных фазах. Нуклеотидная последовательность для «32 000»-подобного белка шпината поразительно похожа на последовательность гена для гербицид-связывающего «32 000»-белка. Однако сериновый остаток в положении 264, вовлеченный в связывание гербицида, отсутствует в соответствующем положении выведенной аминокислотной последовательности в «32 000»-подобном белке [4]. Консервативные элементы пролин-фенилаланин-гистидин-метионин, имеющиеся в трансмембранном участке 32 000-белка и «32 000»-подобного белка, обнаруживаются и в М и L субъединицах реакционного центра фотосинтезирующих бактерий, которые, по-видимому, участвуют в свя-

зывании хинона и/или гербицида атразина [58]. Можно предполагать, что два 32 000 типа белков высших растений и зеленых водорослей также кооперативно участвуют в этих процессах.

Хотя общая гомология между белками фотосистемы II примерно 20% (апопротеины) и 25% (32 000-белки), имеются четко выраженные домены большей гомологии (40—60%) в полипептидных цепях, большинство из которых совпадает с трансмембранными участками [4].

Гены для апопротеина P700-хлорофилл а-белкового комплекса фотосистемы I. Ген для апо P700-Хл. а-БК локализован на хлДНК гороха [47]. Весь кодирующий район гена для P700-Хл. а-БК содержится в пределах 2,7 тыс. п. н. Bg/II-ClaI-фрагмента. Введение этого фрагмента в систему сопряженной транскрипции-трансляции ведет к образованию двух полипептидов размером 90 000 и 80 000, которые специфически иммунопреципитируются с антителами к Хл. а-БК фотосистемы I.

Все три пары белков фотосистем у шпината (апоP680-Хл. а-БК и 44 000 апоХл. а-БК; 32 000-белок и «32 000»-подобный белок; апопротеины P700-Хл. а-БКов) содержат консервативные, часто характерным образом разделенные друг от друга аминокислотные остатки, включая гистидин и цистеин. Семь гистидиновых остатков локализованы в эквивалентных или родственных положениях в апопротеинах, и сходная картина наблюдается для 32 000-белков. Это — сильный аргумент в пользу предположения, что полипептидные цепи каждой пары белков согнуты сходным образом внутри мембраны и могут выполнять сходные функции. Анализ гидрофобности показывает, что 44 000 апоХл. а-БК и «32 000»-подобный белок шпината имеют по 7 гидрофобных районов, апоP680-Хл. а-БК имеет 8 таких районов, 7 из них родственным районам 44 000 апоХл. а-БК. Совместно эти выявленные гомологии и структурные корреляции указывают на то, что эти три пары родственных белков могли возникнуть в процессе эволюции посредством серии дупликаций некоей исходной последовательности ДНК и представляют собой семейство белков, которые осуществляют сбор квантов света и превращения световой энергии [4].

Гены для комплекса цитохромов b—f. Хлоропласты содержат связанные с тилакоидными мембранами комплексы цитохромов, который функционировал как пластохинон-пластоцианин-оксидоредуктаза и, таким образом, замыкает электронно-транспортную цепь между фотосистемами II и I. Комплекс, изолированный из шпината, содержит цитохромы f и b-563, высокопотенциальный железо-серный центр и 17 500-полипептид, не имеющий установленной редокс-функции [28]. Как химически неактивный очищенный цитохром b—f-комплекс, изолированный из хлоропластов гороха, также содержит цитохромы f и b-563, не содержит железо-серного центра и имеет два компонента с молекулярной массой 34 000 и 15 200 [42]. 15 200-полипептид, вероятно, гомологичен 17 500-полипептиду шпинатного комплекса, 34 000-полипептид имеет иммунохимическое сходство с ферридоксин-НАДФ-оксидоредуктазой. Ген для цитохрома f был локализован в хлДНК гороха посредством сопряженной транскрипции-трансляции изолированных хлДНК и фрагментов с рестрикции [54], а гены для цитохромов f и b-563 и 17 500-полипептида были идентифицированы и картированы на хлДНК шпината посредством гибридизации с мРНК и транскрипции-трансляции клонированных фрагментов ДНК [3].

Анализ нуклеотидной последовательности гена хлДНК гороха, кодирующего цитохром f, показал, что зрелый белок состоит из 285 аминокислот и имеет молекулярную массу 31 800 [55]. Сопряженная транскрипция-трансляция клонированных фрагментов рестрикции

хпДНК гороха указывает на то, что цитохром *f* синтезируется в форме большей, чем зрелый белок [54]. Это вызвано наличием дополнительной последовательности на N-конце [55]. Часть ее сходна с сигнальной последовательностью, направляющей белки в мембрану.

Сравнение генов цитохрома *f* у гороха и пшеницы выявило различия в локализации этих генов на рестрикционных картах хпДНК, 85%-ную гомологию нуклеотидных последовательностей генов и 88%-ную гомологию аминокислотных последовательностей выведенных белков; гем-связывающий район и гидрофобная C-концевая последовательность оказались в высшей степени гомологичными у этих двух видов [56].

Локализация и секвенирование гена для 15 200 полипептида комплекса цитохромов *b*—*f* были проведены у гороха [43]. Выведенная аминокислотная последовательность 15 200 полипептида гомологична C-концевой части митохондриального цитохрома *b*, и возможно, что область наибольшей гомологии в обоих комплексах (хлоропластном и митохондриальном) выполняет идентичную функцию [43].

Гены для субъединиц АТФ-синтазы. Показано, что три из пяти субъединиц *CF₁*-части АТФ-синтазы синтезируется в изолированных хлоропластах [36, 39]. Положения генов для этих субъединиц были определены на хпДНК из шпината [52]. Установлено, что две из трех субъединиц *CF₀*-части хлоропластной АТФ-синтазы синтезируются в изолированных хлоропластах. Это субъединица I с молекулярной массой 15 500 [39] и субъединица III, связывающая дициклогексилкарбодимид (DCCD), с молекулярной массой в 8000 [15].

Нуклеотидные последовательности *atpB* и *atpE* были установлены для шпината [60] и кукурузы [31]. Наиболее интересной особенностью этих последовательностей является перекрывание в 4 п. н. транслируемых районов *atpB* и *atpE* у шпината, кукурузы и пшеницы. ТГА-кодоны терминирования трансляции гена *atpB* предшествуют А, который образует кодон АТГ для инициации метионином трансляции *atpE*. Это значит, что два белка транслируются в различных рамках считывания. Поскольку *atpB* и *atpE* у шпината гибридизуются с одним и тем же транскриптом РНК, 2,4 тыс. п. н., следовательно, оба гена транскрибируются в общую мРНК. Играет ли эта организация какую-либо роль в координации экспрессии двух субъединиц, неизвестно. Однако перекрывающаяся трансляция кодона окончания/начала не является существенным признаком этих двух генов, потому что те же самые гены в хпДНК гороха [53] разделены 22 нуклеотидами. Как и у шпината, *atpB* и *atpE* гороха гибридизуются с одним и тем же РНК-транскриптом размером примерно в 2,4 тыс. п. н. и должны быть транскрибированы в виде двугенной мРНК.

По данным рекомбинационного и комплементационного анализа 16 независимо изолированных мутантов по хлоропластной АТФазе отнесены к пяти различным хлоропластным генам *Chl. reinhardtii*. Один из них (*ac-u-c*) был локализован на физической карте хпДНК с помощью делеционных мутаций в районе перекрывания фрагментов *Bam* 10/*Eco* 11. Было показано, что клонированный ген *atpB* шпината специфически гибридизуется с взаимно перекрывающимися фрагментами *Bam* 10 и *Eco* 11. Таким образом, хламидомонадный ген *ac-u-c* соответствует, по всей вероятности, гену *atpB* [57].

ХпДНК гороха содержит только одну копию инвертированной повторенной последовательности, в отличие от хпДНК большинства других изученных видов высших растений. Существенные отличия в организации хпДНК гороха по сравнению с хпДНК шпината и ма-ша обнаружены и при анализе гибридизации фрагментов [44]. Однако гены для субъединиц АТФазы организованы в хпДНК гороха так-

же в два кластера [28]. Сохранение одних и тех же кластеров у шпината, пшеницы и гороха [26--28, 52] может означать, что такая организация важна для кооперативной экспрессии этих генов. Эти же два кластера обнаружены у хламидомонады, хотя в отличие от высших растений две пары генов субъединицы АТФазы отделены друг от друга инвертированным повтором [57].

Ген для большой субъединицы рибулезо-1,5-бисфосфат-карбоксилазы/оксигеназы РБФК-*rbcL*. Аргументы в пользу того, что хлДНК содержит *rbcL*, перечислены в обзоре [5]. С тех пор положение этого гена на рестрикционных картах хлДНК было установлено для ряда растений [53].

У *Oenothera hookeri* описан мутант 1σ с нарушенной активностью РБФК/О [25]. Сопряженная транскрипция-трансляция хлДНК или трансляция хлРНК, выделенной из мутанта, приводят к образованию большой субъединицы (БС) РБФК/О с молекулярной массой около 30 000, тогда как масса БС РБФК/О дикого типа составляет 52 000. Сопоставление размеров этих двух полипептидов указывает на то, что мутация произошла на расстоянии примерно в 900 п. н. от сайта инициации трансляции гена. Размеры мРНК для БС РБФК/О у мутанта и у дикого типа одинаковы. Это означает, что мутация у 1σ не является крупной делецией и, по всей вероятности, является точковой мутацией, вызывающей появление стоп-сигнала в мутантном гене, что приводит к преждевременной термации трансляции. Укороченный полипептид синтезируется у мутанта 1σ и *in vivo*.

Малая субъединица (МС) РБФК/О у мутанта 1σ нормально транскрибируется, но уровень накопления зрелой МС РБФК/О весьма низок. Возможно, что неспособность урезанного полипептида БС РБФК/О у мутанта участвовать совместно с МС РБФК/О в процессе сборки зрелого фермента приводит к уменьшению уровня накопления МС РБФК/О. Полученные данные [25] указывают на то, что механизм, действующий до или после трансляции, играет важную роль в биогенезе РБФК/О помимо контроля на уровне транскрипции.

Мутант *Chl. reinhardtii* 10-6С образует неактивный фермент с более высокой изоэлектрической точкой БС РБФК/О [48]. Секвенирование ДНК показывает, что мутант 10-6С возник в результате мутации нуклеотида в 171 нуклеотидном остатке гена для БС РБФК/О, приводящей к замещению глицина на аспарагин [17]. Это был первый случай установления нуклеотидной последовательности для мутанта по хлоропластному гену. С помощью теста на генетическую рекомбинацию среди 78 светочувствительных мутантов *Chl. reinhardtii* по хлДНК было выделено 2 мутанта, не дающих рекомбинации с 10-6С [49]. Оба эти мутанта оказались полностью лишены РБФК/О [49].

Анализ гибридного потомства позволил картировать мутацию штамма 10-6С *Chl. reinhardtii* на рекомбинационной карте хлоропластных генов [37]. Соответствующий ген назван *rcl-u-1* (символом интратенал обозначена принадлежность к однопородельски наследуемым генам). Авторы сделали попытку сопоставить физическую и рекомбинационную карту хлДНК на основании данных одного из своих скрещиваний [37]. Предполагая, что все маркеры в этом скрещивании находятся на одной и той же кольцевой молекуле хлДНК размером 190 тыс. п. н., они выдвинули гипотезу, представленную на рисунке. Основным элементом этой гипотезы является предположение о том, что другой механизм, вызывающий рекомбинацию в хлоропластах *Chl. reinhardtii*, будет также катализировать рекомбинацию между двумя копиями повтора (в районе R), рис. 1. Это будет приводить к образованию двух изомеров молекулы хлДНК, которые отличаются только относительной ориентацией двух уникаль-

ных районов. У *Phaseolus vulgaris*, где вопрос о наличии таких изомеров подвергся специальному изучению, оба они были обнаружены и примерно в равных количествах [40]. Такая изомеризация будет давать карту, в которой частоты рекомбинации не будут иметь линейного соответствия с физическими расстояниями, простирающимися через повтор. Генетическое расстояние между генами, разделенными районом повтора, будет определяться средним из физических расстояний в двух изомерах. Расположение маркеров, представленное на рис. 1, основано на известной локализации мутации 10-6С в гене БС РБФК/О (*rcl-u-l*; *gbcL*) [17] и на генетических данных [37].

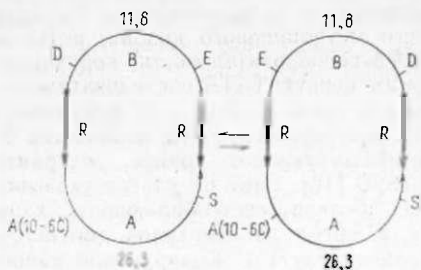
rbcL из *Chl. reinhardtii* [16], кукурузы [35, 44] и из шпината [61] полностью секвенирован. Сравнение последовательностей шпината и кукурузы обнаруживает множество интересных особенностей. В пределах транслируемых рай-

онов нуклеотидные последовательности в высшей степени консервативны (84% гомологии). Многие из нуклеотидных замен — «молчащие», обычно происходят в третьем положении кодона, и, таким образом, общая гомология аминокислот составляет около 90%. Консервативность аминокислотных последовательностей особенно высока в активных позициях. Например, существует полная гомология между 17 аминокислотными остатками вокруг лизина, который [33, 34] ответствен за связывание CO_2 . В трех триптических пептидах, которые, как было показано, лежат около РБФ-связывающего сайта [23], есть только два различия между кукурузной и шпинатной аминокислотными последовательностями. Гомология этих районов составляет 95%.

Одним из различий между *rbcL* из шпината и кукурузы является длина 5'-нетранслируемых лидирующих последовательностей [35, 61]. Транскрипция *rbcL* шпината инициируется на расстоянии 178—179 п. н. от начала трансляции, а у кукурузы — на расстоянии 63—64 п. н. Возможно, что последовательности в этом районе вовлечены в регуляцию транскрипции, и в связи с этим уместно отметить, что у кукурузы, в отличие от шпината, мРНК БС РБФК/О по-разному экспрессируется в клетках мезофилла и в клетках обкладки проводящих пучков.

ЯДЕРНЫЕ ГЕНЫ

Ген для апопротеина светособирающего хлорофилла *a/b*-белкового комплекса (апоХл. *a/b*-БК). Ядерный ген АВ80, кодирующий апоХл. *a/b*-БК (полипептид 15) был недавно изолирован из библиотеки фрагментов ДНК гороха, клонированных в λ -фаге Харон 4 [11]. Была определена последовательность нуклеотидов в этом гене и было показано, что он содержит непрерывную рамку считывания для 269 аминокислот, соответствующих предшественнику основного белка апоХл. *a/b*-БК. Исследования с помощью нуклеазы S1 позволили опре-



Генетическая карта хлоропластных генов *Chlamydomonas reinhardtii*, находящаяся в соответствии с их физической картой.

Жирной линией показаны районы инвертированных повторов (R); цифры на карте соответствуют значениям частот рекомбинации между генами; A (10-6C) — маркер БС РБФК/О. D — маркер диурон-устойчивости. E — маркер эритромицин-устойчивости. S — маркер стрептомицин-устойчивости.

делить «вершину» АВ80. Первый метиониновый кодон в 3'-направлении от этого места находится на расстоянии в 69 нуклеотидов и является инициирующим кодоном открытой рамки считывания. Последовательность «ТАТА» встречается на расстоянии в 31 нуклеотид в 5'-направлении от сайта «вершины». Вторая «ТАТА»-последовательность встречается на расстоянии в 7 нуклеотидов на 5'-конце от инициирующего метионинового кодона, и последовательности, окружающие эту ТАТА-последовательность, поразительно схожи с таковыми, окружающими первую ТАТА-последовательность. Это сходство последовательностей свидетельствует о функциональном сходстве. Зрелый полипептид, кодируемый АВ80, отличается 5 аминокислотами от полипептида, соответствующего ранее охарактеризованной последовательности рАВ96 [12]. Этот результат указывает на гетерогенность среди основных белков светособирающего хлорофилл *a/b*-белкового комплекса (т. е. среди полипептидов, соответствующих по молекулярной массе полипептиду 15). Кодирующий район АВ80 не содержит экзонов, в отличие от генов, контролирующих малую субъединицу МС РБФК/О.

Оба пептида переносчика (как для апоХл. *a/b*-БК, так и для МС РБФК/О) — основные, богаты серином и лишены скоплений гидрофобных аминокислот, характерных для сигнальных последовательностей экскреторных белков.

Выведенная аминокислотная последовательность полипептида 15 дает информацию для предсказания его ориентации в мембране тилакоида, а также его роли в связывании хлорофилла. В нескольких лабораториях было показано, что обработка трипсином тилакоидов приводит к отщеплению концевой фрагмента размером в 2000 от полипептида 15. После очистки отщепленного фрагмента удалось установить часть его аминокислотной последовательности: Сер-Ала-Тре-Тре-Лиз-Лиз. Однако не было установлено, был ли этот полипептид получен с NH_2 - или с карбоксильного конца. По данным, полученным при анализе последовательности гена АВ80, последовательность Арг-Лиз-Сер-Ала-Тре-Тре-Лиз-Лиз встречается на NH_2 -конце зрелого полипептида, кодируемого АВ80 [11]. Таким образом, полипептид 15 своим NH_2 -концевым сегментом погружен в тилакоидную мембрану. Измерение пигмент-белкового соотношения выявляет, что каждая цепь полипептида 15 связывает по крайней мере 11 молекул хлорофиллов *a* и *b* [11]. Точное взаимоположение хлорофиллов и апопротеина не известно. В светособирающем бактериохлорофилл-белковом комплексе 6 карбонильных групп бактериохлорофилла, как полагают [21], образуют водородные связи с протон-донорными боковыми цепями аминокислот в апопротеине. Уместно отметить, что в полипептиде 15 имеет место присутствие таких аминокислот (например, серина, треонина и т. д.). Аминокислотная последовательность полипептида 15, установленная в результате расщепления последовательности нуклеотидов в клоне кДНК рАВ96, оказалась полезной при выявлении молекулярной топографии апоХл. *a/b* в тилакоидной мембране [13]. Когда к этой последовательности был применен новый метод расчета переходов единиц пептида из водной фазы в гидрофобные районы липидного бислоя, оказалось, что 4 участка аминокислотной последовательности встроены или проникают в мембрану. Они состоят из остатков 60—75, 82—98, 110—113 и 178—190 [13].

Ген для малой субъединицы рибулез-1,5-бисфосфат карбоксилаз-оксигеназы и для пептида-переносчика. Клон рSS15 содержит вставку кДНК, насчитывающую 691 пару оснований, кодирующую МС РБФК Олиа гороха [12]. Нуклеотиды с 1 по 100 кодируют 33 аминокислоты пептида-переносчика. Зрелый полипептид (123 аминокислоты) кодируется нуклеотидами со 101 по 468. Вслед за кодоном терми-

нации (ТГА) идут 148 нуклеотидов 3'-некодирующей последовательности, предшествующей поли(А)хвосту.

Аминокислотная последовательность пептида-переносчика и всего зрелого белка МС РБФК/О была выведена на основе последовательности ДНК рSS15. NH₂-конец зрелой МС РБФК/О был идентифицирован сравнением выведенной аминокислотной последовательности с таковой очищенного пептида. В другом исследовании сообщалось о нуклеотидной последовательности клона кДНК гороха, рSSU1, кодирующей предшественник МС РБФК/О. Сравнение последовательностей кДНК рSSU1 и рSS15 выявило в них несколько различий [12]. 10 нуклеотидных различий изменяют 8 аминокислотных кодонов в зрелом полипептиде, не изменяя при этом их общего заряда. 6 различий встречаются в третьем основании кодона и являются «молчащими» изменениями. Значительные отличия в последовательностях имеют место также в 3'-некодирующем районе, предваряющем поли(А)хвост. Они отражают либо межштаммовые различия, либо, что более вероятно, наличие нескольких видов мРНК МС РБФК/О. Действительно, анализ гибридизации на фильтрах свидетельствует о том, что МС РБФК/О кодирует маленькое полигенное семейство [12]. Эти результаты позволяют предполагать, что два независимо изолированных клона кДНК рSSU1 и рSS15 ведут свое происхождение от различных генов, каждый из которых проявляется *in vivo*. В дополнение к 123 аминокислотам, составляющим зрелый белок, структурный ген МС РБФК/О также кодирует NH₂-концевой пептид-переносчик, который имеет установленную молекулярную массу в 4000—5000.

рSS15 кодирует 33 аминокислотных остатка, не встречающихся в зрелом белке, и эти добавочные аминокислоты имеют суммарную молекулярную массу 3800. Хотя 6 из первых 12 остатков зрелого белка МС РБФК/О одинаковы в аминокислотных последовательностях хламидомонады и гороха, между аминокислотными последовательностями двух транспортных пептидов не наблюдается гомологии. Транспортный пептид гороха содержит значительное количество положительно заряженных аминокислотных остатков, как и его аналог у *Chlamydomonas*. Эта структурная особенность может играть важную роль в первоначальном взаимодействии предшественника с отрицательно заряженной оболочкой хлоропласта. Недавно к пептиду-переносчику МС РБФК/О, клонированному в плазмиде, способной экспрессироваться в *E. coli*, были применены методы сайт-специфического и делеционного мутагенеза [6] с целью дальнейшего выяснения особенностей функционирования пептида.

На расстоянии в 18 нуклеотидов от поли(А)хвоста структурного гена для МС РБФК/О располагается (у клона рSS15) гексануклеотидная последовательность ААТГАА. Локализация этой последовательности сходна с расположением гексануклеотида «ААТААА», обнаруживаемого во многих эукариотических мРНК. Высказывалось мнение, что эта последовательность служит сигналом для добавки поли-А или для терминации транскрипции. Сопоставление 3'-некодирующего района рSS15 и рSSU1 показало, что, хотя общая гомология низка, гексануклеотид ААТГАА содержится в пределах последовательности из 22 нуклеотидов, которая идентична у обоих клонов. Однако эта последовательность у рSSU1 располагается на расстоянии в 140 нуклеотидов от поли(А)хвоста.

Недавно, с использованием Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens* 973 нуклеотида, лежащие «вверх по течению» от гена МС РБФК/О гороха, помещенные перед бактериальным геном хлорамфеникол-ацетилтрансферазы [24], в составе химерного гена были введены в генном ткани табака. При этом экспрессия бактериального гена стала

светорегулируемой. Это — строгое доказательство того, что последовательности, предвещающие ген МС РБФК/О, ответственны, по крайней мере отчасти, за его регуляцию действием света.

Summary

Examples of physical mapping, molecular cloning and sequencing of the genes encoding chloroplast proteins have been reviewed. The genes located on chloroplast DNA carry prokaryotic features in their molecular organization. The corresponding proteins are usually synthesized as large precursors and undergo posttranslational processing. These proteins include components of photosynthetic apparatus synthesized within the chloroplast, and subunits of chloroplast protein synthesis elongation factor. There are only two known examples of cloned sequences of the structural part of nuclear genes encoding chloroplast proteins. They are the genes for major chloroplast proteins: the apoprotein of the chlorophyll *a/b*-protein complex, and the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase.

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Газарян К. Г., Тарантул В. З. Геном эукариот. Молекулярная организация и экспрессия. М., 1983. 272 с.
2. Инге-Веттолов С. Г. Введение в молекулярную генетику. М., 1983. 343 с.
3. Alt J., Westhoff P., Sears B. B. e. a. Genes and transcripts for the polypeptides of the cytochrome *b₆/f* complex from spinach thylakoid membranes. — EMBO Journal, 1983, vol. 2, p. 979—986.
4. Alt J., Morris J., Westhoff P. e. a. Nucleotide sequence of the clustered genes for the 44kd chlorophyll *a* apoprotein and the "32kd"-like protein of the photosystem II reaction center in the spinach plastid chromosome. — Current Genetics, 1984, vol. 8, p. 597—606.
5. Bedbrook J. R., Kolodner R. The structure of chloroplast DNA. — Ann. Rev. Plant Physiology, 1979, vol. 30, p. 593—620.
6. Bell E., McIntosh L. Molecular basis of transit peptide function. — Plant Physiol. Supplement, 1984, vol. 75, N 1, p. 64.
7. Bogorad L. The chloroplast, its genome and possibilities for genetically manipulating plants. — In: Genetic engineering, vol. 1 / Ed. by J. K. Setlow and A. Hollaender. New York, 1980, p. 181—203.
8. Bogorad L., Gubbins E. J., Krebbers F. e. a. Cloning and physical mapping of maize plastid genes. — In: Methods in enzymology, 1983, vol. 97, part K, p. 524—554.
9. Bovenberg W. A., Koes R. E., Kool A. J. e. a. Physical mapping, nucleotide sequencing and expression in *E. coli* minicells of the gene for the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase from *Petunia hybrida*. — Current Genetics, 1984, vol. 8, p. 231—241.
10. Broglie R., Bellemare G., Bartlett S. G., e. a. Cloned DNA sequences complementary to mRNAs encoding precursors to the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and a chlorophyll *a/b* binding polypeptide. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, vol. 78, N 12, p. 7304—7308.
11. Cashmore A. R. Structure and expression of a pea nuclear gene encoding a chlorophyll *a/b*-binding polypeptide. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, vol. 81, p. 2960—2964.
12. Corruzi G., Broglie R., Cashmore A., e. a. Nucleotide sequences of two pea cDNA clones encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and the major chlorophyll *a/b* binding thylakoid polypeptide. — J. Biol. Chem., 1983, vol. 258, N 3, p. 1399—1402.
13. Davis D. Application of a method for predicting regions of proteins imbedded within membranes to the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein. — Plant Physiol. Suppl., 1984, vol. 75, N 1, p. 171.
14. Devo H., Shinozaki K., Sugiura M. Nucleotide sequence of tobacco chloroplast gene for the alpha subunit of protein-translocating ATPase. — Nucl. Acids Res., 1983, vol. 11, p. 2185—2191.
15. Doherty A., Gray J. C. Synthesis of a dicyclohexylcarbo-diimide-binding probe by isolated pea chloroplasts. — Eur. J. Biochem., 1980, vol. 108, p. 131—136.
16. Dron M., Rahire M., Rochaix J.-D. Sequence of the chloroplast DNA region of *Chlamydomonas reinhardtii* containing the gene of the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase and parts of its flanking genes. — J. Mol. Biol., 1982, vol. 162, p. 793.
17. Dron M., Rahire M., Rochaix J.-D. e. a. First DNA sequence of a chloroplast mutation: a nucleotide alteration in the ribulose-bisphosphate carboxylase large subunit gene. — Plant Cell, 1983, vol. 9, p. 321—324.
18. Edwards M. Nucleic acids of chloroplasts and mitochondria. — In: The biochemistry of plants, vol. 6: Proteins and nucleic acids / Ed. A. Marcus. p. 249—301. New York, 1981.

19. Galloway R. E., Mets L. J. Atrazine, bromacil and diuron resistance in *Chlamydomonas*. A single non-mendelian genetic locus controls the structure of the thylakoid binding site. — *Plant Physiol.*, 1984, vol. 74, N 3, p. 469—474.
20. Gelvin S., Heizman P., Howell S. N. Identification and cloning of the chloroplast gene coding for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from *Chlamydomonas reinhardtii*. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, vol. 74, N 8, p. 3193—3197.
21. Gogel G. E., Parkes P. S., Brunisholz R. A. e. a. Complete amino acid sequence of the light-harvesting protein from *Phodospirillum rubrum*. — *Biophys. J.*, 1982, vol. 37, N 2, pt 2, p. 109a.
22. Goloubinoff P., Edelman M., Hallick R. B. Chloroplast-coded atrazine resistance in *Solanum nigrum*: psbA loci from susceptible and resistant biotypes are isogenic except for a single codon change. — *Nucl. Acids Res.*, 1984, vol. 12, p. 9489—9496.
23. Hartman F. C., Norton I. L., Stringer C. D. e. a. Attempts to apply affinity labelling techniques to ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase. — In: *Photosynthetic carbon assimilation* / Ed. H. W. Siegelman, G. Hind, p. 245—269. New York; London, 1978.
24. Herrera-Estrella L., Van den Broeck G., Maenhaut R. e. a. Light-inducible and chloroplast associated expression of a chimaeric gene introduced into *Nicotiana tabacum* using a Ti plasmid vector. — *Nature*, 1984, vol. 310, p. 115—120.
25. Hildebrandt J., Bottomley W., Moser J. e. a. A plasmote mutant of *Oenothera hookeri* has a lesion in the gene for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, vol. 783, p. 67—73.
26. Howe C. J., Aufrett A. D., Doherty A. e. a. Location and nucleotide sequence of the gene for the proton-translocating subunit of wheat chloroplast ATP synthase. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, p. 6903—6907.
27. Howe C. J., Bowman C. M., Dyer T. A. e. a. Localization of wheat chloroplast genes for the beta and epsilon subunits of ATP synthase. — *Mol. Gen. Genetics*, 1982, vol. 186, p. 525—530.
28. Hurt E., Hauska G. A cytochrome b-f complex of five polypeptides with plastoquinol-plasocyanin oxidoreductase activity from spinach chloroplasts. — *Eur. J. Biochem.*, 1981, vol. 117, p. 591—599.
29. Huttly A. K., Gray J. C. Localization of genes for four ATP synthase subunits in pea chloroplast DNA. — *Mol. Gen. Genet.*, 1984, vol. 194, p. 402—409.
30. Kirk J. T. O., Tilney-Bassett R. A. E. The plastids, Their chemistry, structure, growth and inheritance. 2nd ed. New York; Amsterdam, 1978. 960 p.
31. Krebbers E. T., Lorrinua I. M., McIntosh L., Bogorad L. The maize chloroplast genes for the beta and epsilon subunits of the photosynthetic coupling factor CF₁ are fused. — *Nucleic Acids Res.*, 1982, vol. 10, p. 4985—5002.
32. Lemaux P. G., Grossman A. R. Isolation of genes encoding phycobiliprotein subunits. — *Plant Physiol. Suppl.*, 1984, vol. 75, N 1, p. 64.
33. Lorimer G. H. Ribulose bisphosphate carboxylase: Amino acid sequence of a peptide bearing the activator carbon dioxide. — *Biochemistry*, 1981, vol. 20, p. 1236—1240.
34. Lorimer G. H., Maziorko M. Carbonate formation on the epsilon-amino group of a lysyl residue as the basis for the activation of ribulosebisphosphate carboxylase by CO₂ and Mg²⁺. — *Biochemistry*, 1980, vol. 19, p. 5321—5328.
35. McIntosh L., Poulsen C., Bogorad L. Chloroplast gene sequence for the large subunit of ribulose bisphosphate carboxylase of maize. — *Nature*, 1980, vol. 288, p. 556—560.
36. Mendiola-Morgenthaler L. R., Morgenthaler J. J., Price C. A. Synthesis of coupling factor CF₁ protein by isolated spinach chloroplasts. — *FEBS Letters*, 1976, vol. 62, p. 96—100.
37. Mets L. J., Geist L. J. Linkage of a known chloroplast gene mutation to the uniparental genome of *Chlamydomonas reinhardtii*. — *Genetics*, 1983, vol. 105, N 3, p. 559—580.
38. Montandon P. E., Stutz E. Nucleotide sequence of a *Euglena gracilis* chloroplast genome region coding for the elongation factor Tu; evidence for a spliced mRNA. — *Nucleic Acids Research*, 1983, vol. 11, p. 5877—5892.
39. Nelson N., Nelson H., Schatz G. Biosynthesis and assembly of the proton translocating adenosine triphosphate complex from chloroplasts. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, p. 1361—1364.
40. Palmer J. D. Chloroplast DNA exists in two orientations. — *Nature*, 1983, vol. 301, p. 92—93.
41. Palmer J. D., Thompson W. F. Chloroplast DNA rearrangements are more frequent when a large repeat sequence is lost. — *Cell*, 1982, vol. 29, p. 537—550.
42. Phillips A. L., Gray J. C. Isolation and characterization of a cytochrome b-f complex from pea chloroplasts. — *Eur. J. Biochem.*, 1983, vol. 137, p. 553—560.
43. Phillips A. L., Gray J. C. Location and nucleotide sequence of the gene for the 15.2 kDa polypeptide of the cytochrome b-f complex from pea chloroplasts. — *Molec. Gen. Genetics*, 1984, vol. 194, p. 477—484.

44. Poulsen C. Comments on the structure and function of the large subunit of the enzyme ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase. — Carlsberg Res. Commun., 1981, vol. 46, p. 259—278.
45. Rochaix J.-E. Organization, function and expression of the chloroplast DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*. — Experientia, 1981, vol. 37, p. 323—332.
46. Rosenberg M., Court D. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. — Ann. Rev. Genet., 1979, vol. 13, p. 319—353.
47. Smith A. G., Gray J. C. Localization of the gene for P700 chlorophyll a protein in pea chloroplast DNA. — Mol. Gen. Genetics, 1984, vol. 194, p. 471—476.
48. Spreitzer R. J., Mets L. J. Non-mendelian mutation affecting ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase structure and activity. — Nature, 1980, vol. 285, p. 114—115.
49. Spreitzer R. J., Ogren W. L. Rapid recovery of chloroplast mutations affecting ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase in *Chlamydomonas reinhardtii*. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, vol. 80, p. 6293—6297.
50. Steinback K. E., McIntosh L., Bogorad L., Arntzen C. J. Identification of the triazine receptor protein as a chloroplast gene product. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, vol. 78, p. 7463—7467.
51. Watson J. C., Surzycki S. J. Extensive sequence homology in the DNA coding for elongation factor Tu from *Escherichia coli* and the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, vol. 79, p. 2264—2267.
52. Westhoff P., Nelson N., Bünemann H. e. a. Localization of genes for coupling factor subunits on the spinach plastid chromosome. — Current Genetics, 1981, vol. 4, p. 109—120.
53. Whitfield P. R., Bottomley W. Organization and structure of chloroplast genes. — Ann. Rev. Plant Physiol., 1983, vol. 34, p. 279—310.
54. Willey D. L., Huttly A. K., Phillips A. L. e. a. Localization of the gene for cytochrome f in pea chloroplast DNA. — Mol. Gen. Genetics, 1983, vol. 189, p. 85—89.
55. Willey D. L., Aufrett A. D., Gray J. C. Structure and topology of cytochrome f in pea chloroplast membranes. — Cell, 1984, vol. 36, p. 555—562.
56. Willey D. L., Howe C. J., Aufrett A. D. e. a. Location and nucleotide sequence of the gene for cytochrome f in wheat chloroplast DNA. — Mol. Gen. Genetics, 1984, vol. 194, p. 416—422.
57. Woessner J. P., Masson A., Harris E. H. e. a. Molecular and genetic analysis of the chloroplast ATPase of *chlamydomonas*. — Plant Molecular Biology, 1984, vol. 3, p. 177—190.
58. Youvan D. C., Marrs B. L. Molecular genetics and the light reactions of photosynthesis. — Cell, 1984, vol. 39, p. 1—3.
59. Zurawski G., Bohnert H. J., Whitfield P. R. e. a. Nucleotide sequence of the gene for the 32,00—Mr thylakoid membrane protein from *Spinacia oleracea* and *Nicotiana debneyi* predicts a totally conserved primary translation product of M_r 38,950. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, vol. 79, p. 7699—7703.
60. Zurawski G., Bottomley W., Whitfield P. R. Structure of the genes for the β and ϵ subunits of spinach chloroplast ATPase indicates a dicistronic mRNA and an overlapping translation stop/start signal. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, vol. 79, p. 6260—6264.
61. Zurawski G., Perot B., Bottomley W. e. a. The structure of the gene for the large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from spinach chloroplast DNA. — Nucleic Acids Res., 1981, vol. 9, p. 3251—3270.

КОНСТРУИРОВАНИЕ ВЕКТОРОВ И КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

И. Я. ХУДЯКОВ

Цианобактерии (синезеленые водоросли) представляют крайне разнородную группу фотоавтотрофных прокариот, занимающую особое место среди бактерий благодаря способности осуществлять окислительный фотосинтез, во всех основных деталях сходный с таковым у высших растений. Многие виды цианобактерий имеют сложный цикл развития, образуют высокоспециализированные клетки — акиноеты и гетероцисты, а также обладают уникальной способностью к аэробной азотфиксации атмосферного азота.

Благодаря этим особенностям цианобактерии являются важными и перспективными объектами биотехнологии и молекулярно-генетических исследований фотосинтеза, регуляции клеточной дифференциации и